

# クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES（選択性強化）

食品中の総大腸菌群及び大腸菌の同時検出・菌数測定用の選択寒天



## 使用目的

クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは食品及び動物飼料の微生物検査に用いられます。この発色性の培地は選択的・鑑別的で、大腸菌及び大腸菌群を食品材料（生牛挽肉、生鶏挽肉、生乳など）から24時間のうちに検出し、鑑別し、菌数測定することができます。

新鮮な食品には通常微生物が多量に含まれますが、負荷や損傷を受けた細菌は一般に含まれていません。夾雑菌が高レベルに存在するとき、望ましくない細菌を阻害して目標細菌の十分な発育を可能にするため、培地の高い選択性が必要となります。

十分に確立されているクロモカルト®コリフォーム寒天培地ですが、このような問題点と重大な要件を果たすため、これを改良する必要があります。タージトール®7を胆汁塩及びプロピオン酸と交換することで、夾雑金が大きく阻害されます。クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは、細菌のバイオバーデンが高い試料中の大腸菌群／大腸菌を同時に検出することができる培地です。

したがってクロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは、新鮮な食品中の大腸菌群／大腸菌検出に適した培地です。

微生物検査は研修を受けたスタッフのみが行ってください。

## 検証試験

クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは、生牛挽肉、生鶏挽肉、生乳の解析のためのPerformance Tested Methods SMプログラムのもとで、AOAC™ Research Instituteにより検証されています。

試験法比較のため、大腸菌群と大腸菌に関する最確数(MPN)法(AOAC™公定法966.24)が用いられました。

その結果、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES法はAOAC™公定法に匹敵することが確認されました。

## 原理

適切なペプトンとMOPSを用いた緩衝の組み合わせにより、大腸菌群の迅速な発育と発色基質の適切な形成が可能になっています。また、胆汁塩とプロピオン酸の存在が、グラム陽性及びグラム陰性の共存菌群の発育を大幅に阻害します。

2つの発色基質の組み合わせにより、総大腸菌群と大腸菌の同時検出が達成されます。大腸菌群に特徴的な $\beta$ -D-ガラクトシダーゼにより、基質であるSalmon™- $\beta$ -D-GALが分解され、大腸菌群コロニーがサーモンピンク～赤に呈色します。また、大腸菌に特徴的な $\beta$ -D-グルクロニダーゼにより基質であるX- $\beta$ -D-グルクロニドが分解され、大腸菌陽性コロニーは青に変色します。

大腸菌はSalmon™- $\beta$ -D-GALとX- $\beta$ -D-グルクロニドの両方を切断するため、そのコロニーは濃紫色となり、サーモンピンク色の他の大腸菌群とは容易に識別できます。

## 組成(g/L)

ペプトン 5.0、塩化カリウム7.5、MOPS 10.0、胆汁酸塩 1.15、プロピオン酸 0.5、寒天 10.0、6-クロロ-3-インドキシル $\beta$ -D-ガラクトピラノシド0.15、イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド0.1、5-ブromo-4-クロロ-3-インドキシル $\beta$ -D-グルクロン酸 0.1。

## 培地の作製

34.5 gを1000 mLの精製水に懸濁し、完全に溶けるまでよく攪拌しながら沸騰させます(約45分)。

### □ オートクレーブ処理しないでくださいー過度の加熱は避けてください

水浴上で培地を直ちに45～50℃に冷やします(2時間を超えると沈殿が生じます)。

pH: 7.0  $\pm$  0.2 (25℃)

培地は無色透明です。

密封したプラスチック製パウチ／バッグに入れて2～8℃で遮光保存したとき、調製後のプレートは2週間保存可能です。

## 試料の調製

Bacteriological Analytical Manual(細菌分析マニュアル)又は本製品に関するISO基準に記述されているものなど、標準的な検査法に従って試料を調製してください。

大腸菌群／大腸菌の発色が試料(低いpHなど)により干渉されないよう、試料を緩衝液で10倍希釈すること、また必要に応じてさらに希釈することをお勧めします(50 gの試料に450 mLのButterfieldのリン酸緩衝液、緩衝ペプトン水又はペプトン食塩緩衝液を添加し、2分間混合するなど)。

## 用途

クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは通常、混濁法で接種します。滅菌済みピペットで1 mLの液状試料(又は適当な希釈液1 mL)を滅菌済みペトリ皿に移します。

培地が液状の間に(ただし45～50℃まで冷やした後)約15 mLのクロモカルト®コリフォーム寒天培地ESを各ペトリ皿に注ぎます。接種液が培地とよく混ざるまで注意深くかき混ぜます。冷えた平面上で混液を固化させます。

接種した皿を反転して(寒天を上にし)、35～37℃で24時間好気条件でインキュベーションします。インキュベーション後、大腸菌と他の大腸菌群の一般的なコロニーの有無を調べます。

# クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES（選択性強化）

## 結果

紺から紫色のコロニーを大腸菌として、サーモンピンクから赤色のコロニーを他の大腸菌群として計数します。

これらの赤と青のコロニー全体を大腸菌群総数とします。

一部の大腸菌（3～4%）はβ-グルクロニダーゼ陰性で、サーモンピンクから赤色のコロニーとして発育します（*E. coli* O157株など）。



*E. coli* 0157 ATCC 1844

β-D-グルクロニダーゼ活性をもつ一部（水色～青緑色のコロニー）を除き、この大腸菌群でない菌は無色のコロニーを形成します。



*Salmonella Urbana* ATCC 9261

大腸菌群の総数はプレート1枚あたり、定型コロニーが150 CFU、総コロニー（総大腸菌群＋その他）が300 CFUを超えないようにします。これらを超えると、コロニーを正確に数えることができません。これらの最高値を超えることが予想される試料は、接種前に希釈してください。

プレートの特徴的コロニー数から、試料1 mL又は1 gあたりの大腸菌及び他の大腸菌群数を計測します。

## 注意

プレートは使用する前に必ず乾燥させてください。寒天表面が濡れていると、表面塗抹法で食品試料をプレートに接種したとき、識別不良で特徴的でないコロニーが形成され、菌数測定が困難になったり、不可能になったりします。

食品試料を使用する際は、混釈法をお勧めします。

## 性能特性

クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESを用いた生牛挽肉、生鶏挽肉、生乳からの大腸菌群／大腸菌の回収率について、内部及びAOAC™が承認した外部検査機関において評価を行っています。

本試験では、大腸菌及び大腸菌群の菌数測定のため、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES法とAOAC™標準法（966.24）を比較しました。この食品試料は予め、自然に混入した大腸菌及び大腸菌群の力価について確認していました。生牛挽肉及び生鶏挽肉の300 gの試料（×3）に、次の様々な量の乾燥接種材料をバッチ接種しました。「少量（目標添加量10 CFU/g）」、「中量（目標添加量10<sup>2</sup> CFU/g）」、「多量（目標添加量10<sup>3</sup> CFU/g）」。

その他、陰性対照として未接種の試料300 gを用意しました。生乳には接種しませんでした。試験開始時の生乳の菌数を、大腸菌と大腸菌群ともに「少量」としました。その後、生乳を35℃で3時間処理して「中量」とし、さらに35℃で3時間処理して「多量」としました。

300 gの各試料から50 gの小分け試料を5つ計量し、無菌希釈液（Butterfieldのリン酸緩衝液）450 mLと2分間混合しました。

混合した後、50 gの試料5つをクロモカルト®コリフォーム寒天培地ESに個別におきました。希釈剤としてButterfieldのリン酸緩衝液99 mLを用いました。全ての食品について混釈法及び塗抹法の両方を用いました。プレートを転倒し、35℃の好気条件で24±1時間インキュベーションしました。紺色又は紫色のコロニーを計測することで推定大腸菌数が得られ、サーモンピンク又は赤色のコロニーを計測することで推定大腸菌群が得られました。大腸菌の定型コロニーの確認をAOAC™法966.24法に従い、その後グラム染色、オキシダーゼ試験、MicroID試験ストリップを使った分析により行いました。

クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESにおいた各50 gの小分け試料も、3連の最確数（MPN）法により検討しました。AOAC™公定法966.24「大腸菌群及び大腸菌のための最確数法」に従いました。L-EMB上の定型的大腸菌コロニーをグラム染色、オキシダーゼ試験及びMicroID試験ストリップを使った分析により確認しました。

# クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES（選択性強化）

メルクのクロモカルト®コリフォーム寒天培地ESは、試験した全種類の食品中の総大腸菌群及び大腸菌を効果的に検出しました。全食品に関して、AOAC™ MPN法966.24により求められた大腸菌群及び大腸菌数は、添加した量にかかわらずクロモカルト®コリフォーム寒天培地ESで得られた結果と一致していました。さらに、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES上の推定大腸菌コロニー（紫色のコロニー）は、全単離株において大腸菌であると確認されました。

同様に、赤色を呈した推定大腸菌群コロニーはすべて、BGLB培地でガスを産生し、大腸菌群であることが確認されました。このことは、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESが食品中に存在する総大腸菌群を正確に数量化できるのみならず、大腸菌を他の大腸菌群バクテリアから恒常的に識別できることも示しています。

大腸菌およびその他の大腸菌群の53の純培養株を、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES上で35°Cで24時間培養しました。大腸菌及びその他の大腸菌群の全株は、特徴的な発育を示しました。クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESの感受性は100%です。

非大腸菌群バクテリアの44の純培養株を、クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES上で35°Cで24時間培養しました。非大腸菌群バクテリアの大半は、無色のコロニーを形成するか、完全に阻害されました。3株のみが青緑色を呈しました。偽陽性反応は認められませんでした。クロモカルト®コリフォーム寒天培地ESの特異性は100%です。

## 保存

無水の培地を、密閉容器内で乾燥して保存します。遮光して保存します。凝集又は変色した培地は使用しないでください。15〜25°Cで保存し、ラベル上の使用期限前に使用してください。

## 使用上の注意

汚染培地及び未使用の培地は、各州／国の法規に従い、安全に廃棄してください。化学物質等安全データシート(MSDS)に各培地の廃棄に関する詳細が記載されています。各成分及び培地の安全性情報は、メルクのChemDATマニュアルに要約されています。ChemDATマニュアルはCD-ROM版をご用意しております。又はInternet [www.chemdat.info](http://www.chemdat.info)からダウンロードすることもできます。

## 文献

**ISO International Standardisation Organisation.** Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations. ISO 7218:1996/Amendment 1:2001.

**ISO International Standardisation Organisation.** Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. ISO 6887- 1:1999.

**Kilian, M. and Bülow, P.** 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84: 245–251.

**U.S. Food and Drug Administration.** 2003. Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 1: Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>, accessed June 24, 2008

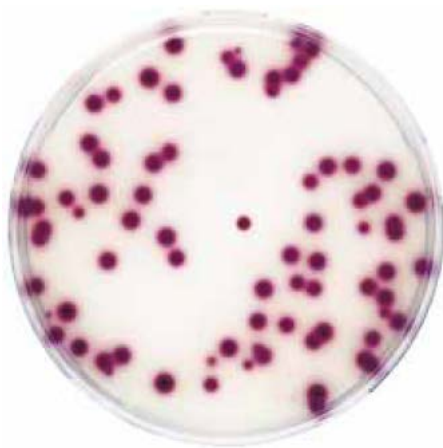
## 注文に関する情報

製品	カタログ番号	包装
クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES（選択性強化）	1.00850.0500	500 g
緩衝ペプトン水 (BPW)	1.07228.0500	500 g
ペプトン食塩（緩衝）液	1.10582.0500	500 g

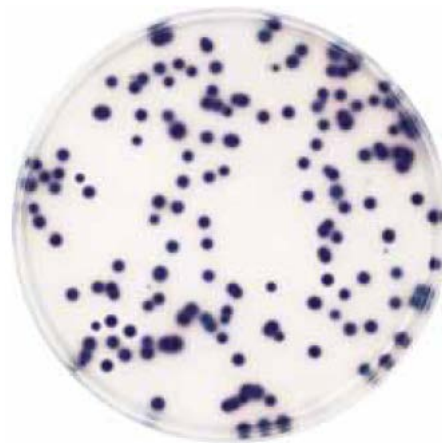
# クロモカルト®コリフォーム寒天培地ES（選択性強化）

## 品質管理

試験株	接種量(CFU/プレート)	回収率、%	コロニーの色
E. coli ATCC 11775	10-100	$\geq 70$	紺～紫色
Citrobacter freundii ATCC 8090	10-100	$\geq 70$	サーモンピンク
Enterobacter cloacae ATCC 13047	10-100	$\geq 70$	サーモンピンク
Salmonella typhimurium ATCC 14028	10-100	限度値なし	無色
Serratia liquefaciens ATCC 27592	$>10^4$	$\leq 0.01$	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	$>10^4$	$\leq 0.01$	
Lactococcus lactis ATCC 19435	$>10^4$	$\leq 0.01$	
Bacillus subtilis ATCC 6633	$>10^4$	$\leq 0.01$	



Citrobacter freundii ATCC 8090



E. coli ATCC 11775